

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143249 B



- (21) Ansøgning nr. 426/77 (51) Int.Cl.³ A 61 K 39/40
(22) Indleveringsdag 2. feb. 1977
(24) Løbedag 2. feb. 1977
(41) Alm. tilgængelig 6. aug. 1977
(44) Fremlagt 3. aug. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 5. feb. 1976, 10866/76, JP

(71) Ansøger THE GREEN CROSS CORPORATION, Osaka, JP.

(72) Opfinder Yuzuru Homma, JP.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

-
- (54) Fremgangsmåde til fremstilling af en vandig gamma-globulinopløsning til terapeutisk anvendelse mod infektioner af *Pseudomonas aeruginosa*.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde af den i kravets indledning angivne art til fremstilling af en vandig γ -globulinopløsning til terapeutisk anvendelse mod infektioner af *Pseudomonas aeruginosa*, hvilken γ -globulinopløsning udviser hæmagglutinin (HA)-titere på mindst 1:28 for OEP (originalt endotoxin protein)-antistof, mindst 1:32 for elastase-antistof og mindst 1:64 for protease-antistof.

Pseudomonas aeruginosa har medført forskellige problemer inden for det medicinske område som en repræsentativ patogen for opportunistiske infektioner, som er blevet genstand for mere opmærksomhed med det betydelige fremskridt inden for den medicinske behandling i dag.

DK 143249 B

Infektionssygdomme med denne bacillus forekommer ofte og er alvorlige i tilfælde af fysiologisk immuninsufficiens hos nyfødte babyer, reduceret immunofunktion hos patienter, som lider af cancer, leukæmia, transplantation og skoldning m.m., såvel som når immunofunktionen inhiberes ved lægemiddelbehandling med steroid, azathioprin, osv.

Nogle få antibiotica over for *Ps. aeruginosa* er blevet udviklet for nylig, men de udviser næppe nogen effektivitet i tilfælde af insufficiens eller sænkning af legemets immunofunktion.

Derfor er der et stærkt ønske om kemoterapi, immunoterapi eller samtidig anvendelse af begge terapier.

I immunoterapien er OEP (originalt endotoxin protein), et almindeligt antigen, som er indeholdt i enhver *Ps. aeruginosa*, og som efter vaccination forhindrer alle infektionssygdomme forårsaget af denne bacillus uden hensyn til arten af *Ps. aeruginosa*-serotyper (13 arter eller mere er blevet fundet til i dag), blevet isoleret og navngivet af opfinderne i denne sag og er allerede blevet anvendt (f.eks. den offentligt tilgængelige japanske patentansøgning nr. 4092/73 og *Jap. Exp. Med.* 42, 23-34, 1972 og *US patentskrift* nr. 3 928 565).

På den anden side er der nogle stammer af *Ps. aeruginosa*, som producerer enzymerne elastase og protease ekstracellulært, men disse enzymer produceres ikke af enhver stamme af *Ps. aeruginosa*, og den producerede mængde er ikke konstant, selv hvis de produceres. Det er almindelig kendt, at stammer, som producerer disse metaboliske stoffer i mere udbredt grad forårsager mere alvorlige patologiske komplikationer, f.eks. corneal ulcus, blødende pneumonia, blødning fra den øvre del af tyndtarmen, septicæmia osv. Foruden OEP-antistof er der fundet antistoffer for disse enzymer i serum af dyr med sygdomme, der skyldes infektion med bakterier, som producerer disse enzymer. Hvad angår det førstnævnte enzym, elastase, er dets fremstillingsmåde og egenskaber rapporteret af opfinderne i denne sag i japansk fremlæggeskrift nr. 27315/65 og *J. Biol. Chem.* 240, 3295 - 3304 (1965).

Fremgangsmåden til fremstilling af det sidstnævnte enzym, protease, og dets egenskaber er blevet beskrevet af opfinderne i japansk frem-

læggelsesskrift nr. 27315/65 og Biochem. Biophys. Acta, 73, 113-124, 125-131 (1963); 92, 351-360, 361-366 (1964); 309, 414-429 (1973).

Den samtidige anvendelse af kemoterapi og immunoterapi er allerede blevet udført, men viser ringe effektivitet, når værtens immunofunktion falder og resulterer i insufficiens af immunofunktionen. Med andre ord kan vaccine ikke være effektiv ved en sådan tilstand, og antibiotica, som kun medfører bakterieinhiberende virkning, viser ringe effektivitet, med mindre der indgives en stor dosis, som imidlertid kan frembringe nogle bivirkninger.

På den anden side har en samtidig anvendelse af humant immunoglobulin og antibiotica været forsøgt til forhindring og behandling af infektionssygdomme forårsaget af *Ps. aeruginosa* (f.eks. Fujii et al: abstract of 4th *Ps. aeruginosa* Research meeting 83 - 87, 1970, Shibata et al. *Chemotherapy*, 18, 991 - 999, 1971). Men det må bemærkes, at ifølge de foreliggende opfinderes resultater, findes kun et spor af OEP-antistof, og mængden af antistof for de ovennævnte elastase og protease er så ringe, at den ikke kan konstateres i kommercielt humant immunoglobulin.

Fra GB patentskrift nr. 1 155 683 kendes en fremgangsmåde til fremstilling af en steril vandig γ -globulinopløsning til anvendelse ved immunoterapi over for infektioner af *Pseudomonas aeruginosa*, hvorved humant serum eller plasma, udvundet fra sunde personer (bloddonorer) som har fået indgivet polyvalente antigener fra to eller flere bestemte stammer af *Pseudomonas aeruginosa*, renses på kendt måde, f.eks. ved Cohns kold-ethanol-fraktioneringsmetode eller ved ammoniumsulfatmetoden.

Immunoterapi med de tidligere fremstillede γ -globulinpræparater har imidlertid ikke altid vist sig effektive over for alle tilfælde af *Pseudomonas aeruginosa*-infektioner, og det skyldes, at man ved den kendte teknik hovedsagligt har anvendt intracellulært toxin, især OEP (originalt endotoxin protein), til immunisering af bloddonorerne.

Imidlertid har det ifølge opfindelsen overraskende vist sig, at der er mikroorganismer, som ekstracellulært producerer sådanne enzymer som elastase og protease, der har en høj toxicitet og for-

årsager corneal ulcus, hæmoragisk pneumonia og septicæmia.

Opfindelsens formål er at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af et α -globulinpræparat som foruden en nødvendig mindste HA-titer med hensyn til OEP-antistof også indeholder nødvendige mindste HA-titere med hensyn til elastase-antistof og protease-antistof, og som derfor er effektivt over for alle *Pseudomonas aeruginosa* infektioner.

Dette opnås med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, som er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

De bedste resultater opnås, når den vandige γ -globulinopløsning fremstilles således, at den indeholder 15-17% af det nævnte γ -globulin.

Humant γ -globulin kan fremstilles ved enhver velkendt fremgangsmåde til opnåelse af γ -globulin ud fra humant plasma, idet der vælges sådanne plasma med høje indhold af OEP-antistof, elastase-antistof og protease-antistof, dvs. HA-titere på mindst 1:32 for OEP-antistof, mindst 1:8 for protease-antistof og mindst 1:8 for elastase-antistof. I det normale humane plasma findes 1:8 (HA-titer) for OEP-antistof, men indholdet af protease- og elastase-antistof er mindre end den konstaterbare kritiske koncentration, og ingen humane immunoglobuliner, fremstillet ud fra det, viser HA-titere for de tre arter af antistoffer, som opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Derfor anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen plasma- eller serummateriale med sådanne højere HA-titere med hensyn til de ovennævnte antistoffer, udvundet fra sunde personer, som en gang har lidt af *Ps. aeruginosa*-infektion, eller fra sunde personer, hvis blod udviser høje HA-titere med hensyn til OEP-, protease- og elastase-antistoffer som resultat af indgivning af vacciner af OEP, protease og elastase af *Ps. aeruginosa*, med anvendelse af en enkelt art eller blanding af to eller flere arter af humant plasma efter forudgående bestemmelse af HA-titere for de førnævnte tre arter af antistoffer i plasma. γ -globulin opnås ved rensning af dette materiale ved almindelige fremgangsmåder, f.eks. Cohn's kold-ethanol-fraktioneringsmetode eller ammoniumsulfat-fraktioneringsmetoden.

HA-titeren for antistoffer, som er omtalt i denne beskrivelse, er beskrevet i "Pseudomonas aeruginosa and its infections" (1975, published by Bunkōdō) side 355 - 359, og vist som titer bestemt ved metoden på basis af passiv hæmagglutination med henholdsvis OEP, protease og elastase som antigener.

Fremgangsmåden er som følger:

Fåreerythrocyter behandles med CO-gas og inkuberes i 0,6% formalin i 24 timer ved 37°C. Der tilsættes tanninsyre opløst i phosphat-pufret saltopløsning i en koncentration på 1:100 000 til et lige så stort volumen 2% celleduspension, og blandingen inkuberes i 15 minutter ved 37°C. Derpå opsamles cellerne ved centrifugering. Til de således opnåede garvede celler sættes et lige så stort volumen OEP-, protease- eller elastase-opløsning, og blandingen inkuberes i 15 minutter ved 37°C. Derpå vaskes cellerne med fortyndingsmidlet to gange. Således fremstilles sensitiverede celler. Hæmagglutinin (HA)-titeren måles ved passiv hæmagglutinations-reaktion med cellerne og udtrykkes som den reciprokke værdi af den maksimale globulinfortynding, hvorved hæmagglutinationen finder sted efter 18 timers henstand ved stuetemperatur. Detaljerne er beskrevet af Tomiyama et al. i Jap. J. Exp. Med. 43 (3) 183 - 189 (1973) for OEP, i Jap. J. Exp. Med. 45 (5) 361 - 365 (1975) for protease og elastase.

Immunoglobulin-opløsningen, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, anvendes med fordel medicinsk som en vandig opløsning indeholdende 150-170 mg/ml ligesom det humane immuno- γ -globulin ifølge den japanske pharmacopé og tillades at indeholde en proteinstabilisator, såsom aminoeddikesyre, og konserveringsmidler, såsom thimerosal, i opløsningen. Et indhold af hvert antistof med højere HA-titer er mere effektivt, og 1:200 eller mere for OEP-antistof og 1:64 eller mere for protease-antistof og elastase-antistof er fordelagtigt. Endvidere kan man ved at behandle dette materiale med pepsin eller plasmin eliminere immuno-globulinets komplement-bindende evne, og der kan opnås γ -globulin, som stadig bevarer antistof-aktivitet, til intravenøs injektion.

Den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede immuno- γ -globulin-opløsning udviser bemærkelsesværdig effektivitet sammenlignet med immuno- γ -globulin ifølge den japanske pharmacopé, når

den indgives i kombination med kemoterapien, f.eks. 3',4'-dideoxykanamycin B (DKB). Effektivitetsforholdet iagttaget på basis af ED₅₀ viser tydeligt en signifikant forskel sammenlignet med DKB alene og immuno- γ -globulin ifølge den japanske pharmacopé alene.

Den vandige γ -globulin-opløsning fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes til behandling af alvorlige infektionssygdomme, såsom human corneal ulcus, intraperitoneale infektionssygdomme, septicæmia og meningitis forårsaget af *Ps. aeruginosa*, for hvilke anvendelsen af en hvilken som helst kemoterapi sammen med den almindelige immunoterapi ikke er effektiv.

Som daglig dosis kræves 150 mg (1,0 ml)/kg som intramuskulær injektion, men patientens forhold skal tages i betragtning for at bestemme doseringen og indgivningshyppigheden.

De efterfølgende eksempler tjener til nærmere at belyse fremgangsmåden ifølge opfindelsen og viser forsøg til bekræftelse af effektiviteten af den fremstillede immuno- γ -globulin-opløsning.

Den ledsagende tegning er en kurve, som viser resultatet af forsøgseksemplet, idet helbredelsesgraden er afsat langs ordinaten efter en logaritmisk målestok, og den indgivne mængde (μ g/mus) af DKB er afsat langs abscissen efter en logaritmisk målestok.

EKSEMPEL

Ammoniumsulfat sættes til 500 ml fremstillet sundt humant plasma med 1:32 (HA-titer) OEP-antistof, 1:8 (HA-titer) protease-antistof og 1:8 (HA-titer) elastase-antistof, således at der blev opnået 22% mætning, og det resulterende bundfald blev isoleret fra overvæsken, hvortil der yderligere sættes ammoniumsulfat, indtil der var opnået 33% mætning. Dette bundfald blev opløst i en passende mængde vand, og den ovennævnte fraktionering med ammoniumsulfat blev gentaget med denne opløsning. Som endeligt bundfald blev opnået 200 g (som tør vægt) γ -globulin, som blev tørret og opløst i vand til fremstilling af en opløsning på 150 mg/ml, og denne vandige opløsning blev opdelt i portioner på 1 ml hver, hvis HA-titrene var 1:200 for OEP-antistof, 1:64 for protease-antistof og 1:64 for elastase-antistof.

FORSØGSEKSEMPEL

Effektivitetsforholdet på corneal infektionssygdom hos mus, forårsaget af levende bakterier, blev bestemt med henholdsvis humant immunoglobulin ifølge den japanske pharmacopé (γ -globulin-indhold 150 mg/ml, OEP-antistof-HA-titer 1:8 eller mindre, protease-antistof-HA-titer og elastase-antistof-HA-titer er mindre end den kritiske bestemmelige koncentration) og den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede γ -globulinopløsning (γ -globulin-indhold 156 mg/ml, OEP-antistof-HA-titer 1:200, protease-antistof-HA-titer 1:64, elastase-antistof-HA-titer 1:64) ved brug sammen med anti-Ps. aeruginosa-antibioticummet, 3',4'-dideoxykanamycin B (DKB).

Bestemmelsen blev udført i overensstemmelse med den metode, som er beskrevet i den japanske J. Exp. Med. Vol. 44 (1974), side 435 - 442.

dd-Y-hunmus (5 uger) blev brugt som forsøgsdyr. Musene blev opdelt i grupper, hvoraf fem grupper blev behandlet ved subcutan injektion med 0,1 ml kommercielt humant immunoglobulin, fem grupper blev injiceret med 0,1 ml af den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede γ -globulinopløsning, og fem grupper var ubehandlede, hvorved hver gruppe bestod af seks mus, og der blev anvendt 90 mus ialt.

Efter 18 timer blev hver mus intramusculært injiceret med 0,2 ml DKB-opløsning, fremstillet ved at opløse DKB i fysiologisk saltvand i koncentrationer på 400 μ g, 200 μ g, 100 μ g, 50 μ g og 25 μ g pr. 0,2 ml, hvorefter disse mus blev bedøvet med ether. Derpå blev cornea beskadiget med en nål (størrelse 1/4) til subcutan injektion under et stereomikroskop for at frembringe en infektion ved indførelse af 0,01 ml af en 10^7 celler/ml suspension af Ps. aeruginosa IFO-1210 stamme, som producerer elastase og protease.

Graden af beskadigelse i cornea hos hver mus blev iagttaget 5 dage efter infektionen og bedømt efter en gradskala på 1-8 ifølge graderne af corneal opacitet, abces og ulcus. 1 betegner ingen patologisk ændring, 2 betegner, at der iagttages en meget svag opacitet i det corneale center, 3 betegner, at der iagttages en tydelig opacitet i det corneale center, 4 betegner, at der iagttages en opacitet i hele cornea-delen, men at der kan findes transparens i for-

kammeret, 5 betegner, at der iagttages en højere grad af opacitet i centeret og ikke findes nogen transparens, 6 betegner, at der iagttages opacitet i hele området og findes en absces i centeret, 7 betegner, at der iagttages tydelig opacitet, som strækker sig over hele området, og findes en absces i centeret, og 8 betegner, at der iagttages ulcus over hele cornea. Således kan graderne 1-2 betragtes som helbredt.

Resultaterne af dette forsøg er vist i tabel 1. ED_{50} og effektivitetsforholdene blev opnået ved Litchfield-Wilcoxon's metode (J. Pharmacol. Exp. Therap. 96, 99 - 113, 1949), og dette forsøgsresultat er vist i tabel 2 og på tegningen.

TABEL 1

DKB / μ g	Grad							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Grupper injiceret med den ifølge opfindelsen fremstillede γ -globulinopløsning	400				1/6			1/6
	200	1/6	1/6					1/6
	100	1/6	1/6					1/6
	50	2/6	1/6					2/6
	25	1/6				1/6	1/6	4/6
Grupper injiceret med kommercielt humant immuniseret globulin	400	3/6		1/6				2/6
	200	1/6			1/6		1/6	2/6
	100							6/6
	50							6/6
	25							6/6
Ubehandlede grupper (kun indgivet DKB)	400	1/6	2/6					2/6
	200	1/6					1/6	4/6
	100							6/6
	50							6/6
	25							6/6

TABEL 2

ED₅₀ og effektivitetsforhold

	ED ₅₀	Effektivitetsforhold	
		DKB alene	Kommercielt humant immuniseret globulin
Ifølge opfindelsen fremstillet γ -globulinopløsning	90 μ g	3,00	1,80
Kommercielt humant immuniseret globulin	400 μ g	0,73	-
DKB alene	620 μ g	-	0,73

(Forhold som viser nogen signifikant forskel er 1,00 eller mere)

P a t e n t k r a v:

Fremgangsmåde til fremstilling af en vandig γ -globulinopløsning til terapeutisk anvendelse mod infektioner af *Pseudomonas aeruginosa*, hvilken γ -globulinopløsning udviser hæmagglutinin(HA)-titere på mindst 1:128 for OEP(originalt endotoxin protein)-antistof, mindst 1:32 for elastase-antistof og mindst 1:64 for protease-antistof, hvilken fremgangsmåde er af den art, hvorved humant serum eller plasma, udvundet fra sunde personer med forøget antistofindhold, underkastes en fraktionering på i og for sig kendt måde ved Cohns kold-ethanol-fraktioneringsmetode eller ved ammoniumsulfat-fraktioneringsmetoden, k e n d e t e g n e t ved, at der som udgangsmateriale anvendes serum eller plasma med HA-titere på mindst 1:32 for OEP-antistof, mindst 1:8 for protease-antistof og mindst 1:8 for elastase-antistof.

Fremdragne publikationer:

Britisk patent nr. 1155683.

